

SZAKMAI BESZÁMOLÓ

Dr. Hamar Péter

A vese ischemia reperfúziós károsodásának gátlása RNS interferencia segítségével.

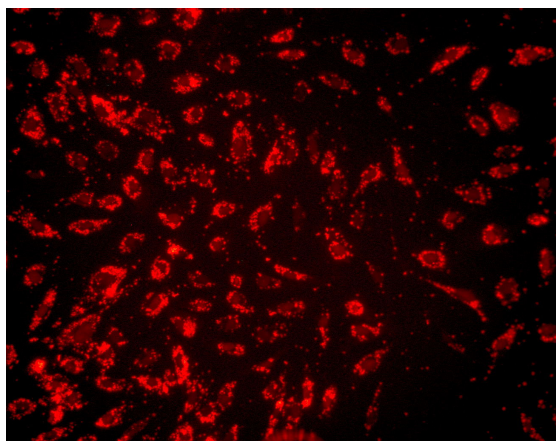
Elvégzett kísérletek, a pályázati tematikának megfelelően:

• Rövid interferáló RNS (siRNS) hatékonyságának növelése

B. Beviteli út változtatása - Az eddig alkalmazott hidrodinamikus kezelés hatékonyságának növelésére a NADPH oxidáz enzim 2-es és 4-es izo-típusát (Nox-2,4) gátló siRNS-t lipofectaminnal keverve vagy anélkül adagoltuk farok vénán vagy direkt vese vénába injektálva vese ischemia-reperfúzió és endotoxin shock modellben, egéren.

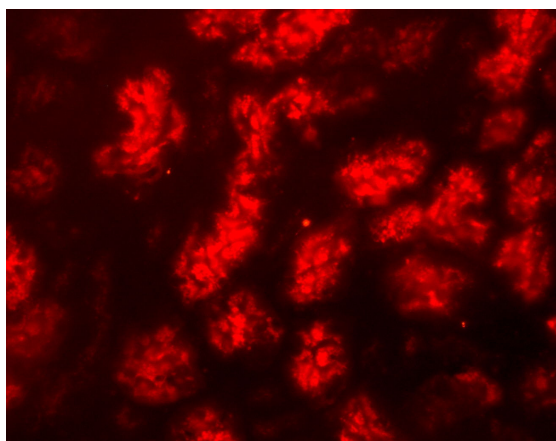
Optimalizáltuk az in-vitro (HUVEC sejtkultúra) és in-vivo (egér vese) bevitel módját.

In vitro transzfekció elektroporációval: optimális elektroporáció mellett a sejtek 93 %-a felvette a fluoreszcensen jelölt siRNS-t, és a sejtek morfológiája is megtartott volt. Túl alacsony siRNS koncentráció mellett alacsony volt a transzfekciós hatékonyság, míg túl magas feszültség károsodott sejtmorfológiát eredményezett. Az in vitro transzfekció az irodalomból ismert transzfekciós reagensekkel nem volt hatásos, viszont sikerült egy elektroporációs protokollt optimalizálni, melynek segítségével a HUVEC sejtek >85%-át sikerült transzfektálni (2.ábra)



1. Ábra: HUVEC, elektroporáció, block-IT Alexa-fluor-vörös fluoreszcens oligonucleotide kezelés. (Leica fluoreszcens mikroszkóp). Megfelelő oligo koncentráció, és feszültség alkalmazásával mind a transzfekciós hatékonyság, mind a sejtek túlélése optimális.

In-vivo: Retrográd vesevéna injektálást követően evans-kék festék a peritubuláris interstitiumban jelent meg. Retrográd vesevéna injektálást követően, megfelelő siRNS koncentráció és volumen adása mellett a vese tubulus epitél sejtek felvették az oligot (Block-IT). A bevitel hatékonyságát jól szemlélteti a 2. ábra.



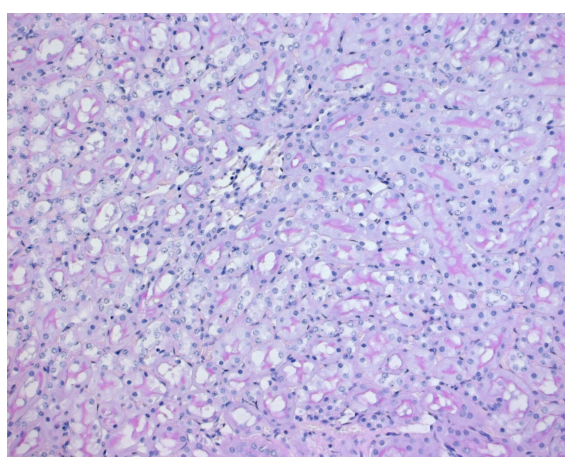
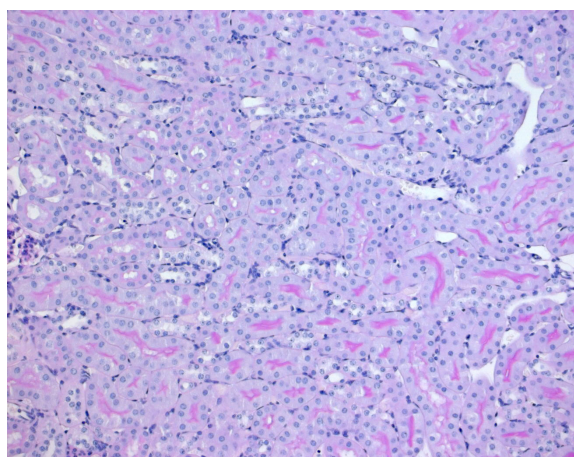
2. Ábra: Egér vesekezelés. Block-IT Alexa-fluor-vörös fluoreszcens oligonucleotide kezelés (Leica fluoreszcens mikroszkóp) a vesevéna lipofectaminnal kevert oligoval a tubulus epitél-sejtek rajzolódni ki.

• Oxidatív stressz gátlása

A. Reaktív oxigén gyök-termelő enzim gátlása: Kísérleteinkben vizsgáltuk a NADPH oxidáz enzim 2-es és 4-es izotípusának (Nox-2,4) szerepét hypoxia-reoxigenáció során RNS interferencia segítségével humán umbilikális véna endothel sejt (HUVEC) tenyészetben és in-vivo egérmodellen.

In-vitro kísérleteinkben optimalizáltuk az oxigén-glukóz depriváció (OGD) és ezt követő reoxigenáció időtartamát úgy, hogy indifferens szekvenciájú siRNS előkezelés mellett az endotél (HUVEC) sejtek ca. 20%-a elpusztul az OGD és további >40% a reoxigenáció során. A modellen jelenleg vizsgáljuk a NADPH oxidáz enzim 2-es és 4-es izotípus (Nox-2,4) gátlásának (siRNS) hatását a sejtek túlélésére. Jelenleg rendszerünkben a szuperoxid kimutatását végezzük dihidroethidin festéssel konfokális mikroszkópia és flow cytometria alkalmazásával.

In-vivo: Nox-2 knockout valamint vad típusú C57Bl6 egereken direkt vesevéna injektálással gátoltuk a Nox-2 és a Nox-4 és xantin-oxidáz (XO) enzimek termelését. Eredményeink szerint bármely oxidatív enzim gátlása javítja a vesefunkciót, és enyhíti a szövettani károsodás mértékét, azonban több enzim egyidejű gátlásával additív hatást nem tudtunk elérni. Jelenleg szuperoxid okozta oxidatív stressz kimutatása céljából nitrotyrosin festést és western blott vizsgálatokat végzünk.



3. ábra: C57Bl6 egér vese ischemia-reperfúzió után. A: NOX-4 siRNS előkezelést követően: ép tubulusok. B: indifferens (kontroll) siRNS előkezelést követően: jelentős tubulus atrófia látszik. (PAS festés, 200x)

• RNS interferencia mellékhatásainak vizsgálata

A. Interferon válasz vizsgálata: kísérleteinkben különböző, korábbi kísérleteink során használt siRNS szekvenciák és a hidrodinamikus kezelés hatásait vizsgáltuk interferon válaszban résztvevő molekulák expressziójára real-time PCR módszerrel. Az interferon válaszra jellemző két gén (STAT-1 és OAS-1) expressziójának fokozódását figyeltük meg hidrodinamikus kezelés során, de siRNS alkalmazás hatására nem.

Real-time PCR vizsgálataink eredményei szerint siRNS kezelőoldathoz adása nem fokozza a STAT-1 és OAS-1 gének expresszióját, viszont kismértékű emelkedés tapasztalható a hidrodinamikus kezelés következtében. Ezen molekuláris eredményeinket szövettani

vizsgálattal is sikerült alátámasztani: a kezelések nem okoztak morfológiai elváltozást. Úgyszintén nem tapasztaltunk gyulladásos citokin emelkedést: pozitív kontrollként alkalmazott Poly I:C kezelés hatására jelentős TNF- α szint volt mérhető az egerek plazmájában (ELISA), de nem a terápiás siRNA-el kezelt egerek plazmájában.

Eredményeinkből készült közleményt az RNA c. folyóirathoz küldtük be.

Összefoglaló közlemények:

Az RNS interferencia lehetséges terápiás és nefrológiai alkalmazásairól két összefoglaló közleményt (Rácz Z, Hamar P. *Curr Med Chem.* 2006, és Rácz Z, Hamar P. *Orv Hetil.* 2008) és egy könyvfejezetet (Rácz Z, Hamar P. *Contrib Nephrol.* 2008) írtunk a CMC és Prof Remuzzi (Contrib Nephrol) felkérésére. A könyvfejezetre máris 10 független hivatkozást kaptunk.

További a vese ischemia-reperfúziós károsodását vizsgáló kísérleteink és közleményeink:

- A vese ischemia-reperfúziós károsodását gátló preconditionálás mechanizmusában a hősokk fehérjék szerepét vizsgáltuk a Biokémiai Intézzel és a Sun-Yat-sen egyetemen dolgozó kollegáinkkal együttműködésben.
- A vese ischemia-reperfúziós károsodásának egy speciális formáját: a röntgen-kontrasztanyag okozta nefropátiát vizsgáltuk általunk létrehozott állatmodellen és klinikai beteganyagon kollaborációban Dr Huber és Dr Heemann munkacsoportjával (Müncheni Műszaki Egyetem (TUM) Orvosi Kar) (Huber et al: *Radiology* 2006).
- A vese ischemia-reperfúziós károsodásának másik speciális formája: a veseátültetés során elszenvedett ischemia és az azt követő reperfúzió, mely az endothelium aktiválása révén meghatározza a graft elleni kilökődési reakció mértékét. Kísérleteinkben vizsgáltuk
 - a/ az átültetés során elszenvedett ischemia-reperfúzió és hideg konzerválás (közlemény megírás alatt)
 - b/ a mátrix metalloproteinázok (Lutz et al: *Transplantation* 2005),
 - c/ valamint a cytotoxikus T-lymphocyták és az idegen antigén elleni immunválasz (Hamar et: *Transplant Int* 2005) kilökődési reakcióban betöltött szerepét.

Az OTKA pályázat beszámolási időszakában jelen OTKA támogatásával is készült közlemények listája:

1. Lutz J, Yao Y, Song E, Antus B, **Hamar P**, Liu S, Heemann U. Inhibition of matrix metalloproteinases during chronic allograft nephropathy in rats. *Transplantation.* **2005** Mar 27;79(6):655-61.
2. **Hamar P**, Lipták P, Heemann U, Iványi B. Ultrastructural analysis of the Fisher to Lewis rat model of chronic allograft nephropathy. *Transpl Int.* **2005.** Jul;18(7):863-70.
3. Bagi Z, **Hamar P**, Kardos M, Koller A. Lack of flow-mediated dilation and enhanced angiotensin II-induced constriction in skeletal muscle arterioles of lupus-prone autoimmune mice. *Lupus.* **2006**;15(6):326-34.
4. Rácz Z, **Hamar P**. Can siRNA technology provide the tools for gene therapy of the future? *Curr Med Chem.* **2006**;13(19):2299-307. Review.

5. Huber W, Eckel F, Hennig M, Rosenbrock H, Wacker A, Saur D, Sennefelder A, Hennico R, Schenk C, Meining A, Schmelz R, Fritsch R, Weiss W, **Hamar P**, Heemann U, Schmid RM. Prophylaxis of contrast material-induced nephropathy in patients in intensive care: acetylcysteine, theophylline, or both? A randomized study. *Radiology*. **2006** Jun;239(3):793-804.
6. **Hamar P**, Kokeny G, Liptak P, Krtil J, Adamczak M, Amann K, Ritz E, Gross ML. The combination of ACE inhibition plus sympathetic denervation is superior to ACE inhibitor monotherapy in the rat renal ablation model. *Nephron Exp Nephrol*. 2007;105(4):e124-36. Epub **2007** Mar 7.
7. Kökény G, Godó M, Nagy E, Kardos M, Kotsch K, Casalis P, Bodor C, Rosivall L, Volk HD, Zenclussen AC, **Hamar P**. Skin disease is prevented but nephritis accelerated by multiple pregnancies in autoimmune MRL/LPR mice. *Lupus*. **2007**;16(7):465-77.
8. Zenclussen AC, Kökény G, Thimm O, Sollwedel A, Godo M, Casalis PA, Zenclussen ML, Volk HD, **Hamar P**. Flare of renal lupus during murine pregnancy is due to increased IgG and C3 glomerular deposition but is independent of Treg function. *Reprod Biomed Online* **2008** 17:114-26.
9. Rácz Z, Hamar P. RNA interference in research and therapy of renal diseases. *Contrib Nephrol*. **2008**;159:78-95.
10. Godó M, Sessler T, **Hamar P**. Role of invariant natural killer T (iNKT) cells in systemic lupus erythematosus. *Curr Med Chem*. **2008**;15(18):1778-87.
11. Rácz Z, **Hamar P**. [SiRNA technology, the gene therapy of the future?]. *Orv Hetil*. **2008** Jan 27;149(4):153-9. Review. Hungarian.
12. Nemeth Z, Kokeny G, Godo M, Mózes M, Rosivall L, Gross ML, Ritz E, **Hamar P**. Increased renoprotection with ACE inhibitor plus aldosterone antagonist as compared to monotherapies--the effect on podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. **2009** Aug 8. [Epub ahead of print].
13. **Hamar P**, Wang M, Godó M, Kökény G, Ouyang N, Heemann U. Lupus nephritis reoccurs following transplantation in the lupus prone (lpr) mouse. *Lupus*. **2009** Sept 8. [Epub ahead of print]
14. Rácz Zs, Nagy E, Rosivall L, Szebeni J, **Hamar P**. Sugar-free intravenous immunoglobulin prevents skin but not renal disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus. *Lupus*. **2009**, [accepted]
15. Kökény G, Németh Z, Godó M, Rosivall L, Ritz E, Gross ML, **Hamar P**. More podocytes and less oxidative stress protects the rowett rat strain from renal fibrosis. *Nephrol Dial Transpl*. **2009**, [Submitted]
16. Rácz Zs, **Hamar P**. No interferon response in mice following systemic siRNA treatment. *RNA*. **2009**, [Submitted]

17. Song E, Wag M, Bodor Cs, Kovacs G, Soti CS, **Hamar P**. Ischemic preconditioning of mouse kidney is mediated via a HSP-90. [under preparation]
18. **Hamar P**, Regős A, Kökény G, Antus B, Rosivall L. Early kidney function following transplantation is influenced primarily by surgical trauma, rather than acute rejection, in rats. [under preparation]
19. Buday A, Örsy P, Mózes M, Kökény G, Koller Á, Ungvári Z, Benyó Z, **Hamar P**: Elevated systemic TGF-beta impairs aortic function through activation of NADPH oxidase in Apo-E -/- mice. [under preparation]